

PCT/DE 99/03974

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EPU

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



09/03/94

REC'D 18 FEB 2000  
WIPO PCT

Bescheinigung

Die november AG Novus Medicatus Bertling Gesellschaft für Molekulare Medizin in Erlangen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Synthetisches Nucleinsäure-Partikel"

am 16. Dezember 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol C 07 K 14/435 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.



München, den 25. Januar 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 198 58 005.3

Weinmayr

A 9161  
06/90  
11/99

### Synthetisches Nucleinsäure-Partikel

Die Erfindung betrifft ein synthetisches Nucleinsäure-Partikel bzw. Partikel, ein Verfahren zu dessen Herstellung sowie eine Verwendung.

Nach dem Stand der Technik ist es bekannt, Komplexverbindungen zwischen doppelsträngigen Oligonukleotiden, polykationischen Polymeren und Lipiden herzustellen. Dazu wird auf die folgenden Literaturstellen verwiesen:

- 10 A.V. Kabanov and V.A. Kabanov (1995): DNA Complexes with polycations for the Delivery of Genetic Material into Cells, Bioconjugate Chem., 6, 7-20;
- 15 Gao and L..Huang (1996): Potentiation of Cationic Liposome-Mediated Gene Delivery by Polycations, Biochemistry, 35, 1027, 1036;
- 20 L. Sorgi, S. Bhattacharya and L. Huang (1997): Protamine sulfate enhances lipid-mediated gene transfer, Gene Therapy, 4, 961-968;
- 25 Li and L. Huang (1997): In vivo gene transfer via intravenous administration of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes, Gene Therapy, 4, 891-900.
- 30 Solche Komplexverbindungen können z.B. zur Transfektion von Plasmid-DNA verwendet werden. Sofern als Polykation an Transferrin gebundenes Protamin verwendet wird, bezeichnet man solche Komplexverbindungen auch als Transferrin-Protamin-DNA-

16.12.90

2

Komplexe. Derartige Komplexe bilden keine kondensierten DNA-Strukturen bzw. Partikel (Wagner, M. Zenke, M. Cotten, H. Beug and M.L. Birnstiel (1990): Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells, Proc. Natl.

- 5 Acad. Sci. U.S.A., 87, 3410-3414).

Die bekannten Komplexverbindungen können nur aus zuvor gebildeten Partikeln oder bestehenden Komplexen gebildet werden. Dazu muß neben einem Protein auch ein Lipid vorhanden sein.

- 10 15 Diese Komplexverbindungen können nachteiligerweise keine partikulären Strukturen aus Oligonukleotiden bilden. Die DNA liegt in der Komplexverbindung nur oberflächlich adsorptiv gebunden vor. Sie kann nachteiligerweise enzymatisch abgebaut werden. Schließlich eignen sich die bekannten Komplexverbindungen nicht zur Herstellung von Arzneimitteln mit Depotwirkung.

- Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es sollen insbesondere ein stabiles synthetisches Partikel und ein Verfahren seiner Herstellung angegeben werden, das eine hohe Transfektionseffektivität ermöglicht. Das synthetische Partikel soll möglichst auch zur Herstellung von Arzneimitteln mit Depotwirkung geeignet sein.

25

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 10 und 22 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 9, 11 bis 21 und 23 bis 25.

- 30 Nach Maßgabe der Erfindung ist ein synthetisches Partikel aus mindestens einer Nukleinsäure- oder Nukleinsäurederivatsequenz und einem Protein mit einem Molekulargewicht von 3900

bis 4300 gebildet. Ein solches synthetisches Partikel ist insbesondere gegenüber einem enzymatischen Abbau stabil. Es ermöglicht eine hohe Transfektionseffizienz sowie die Herstellung von Arzneimitteln mit Depotwirkung.

5

Nach einem Ausgestaltungsmerkmal besteht das Protein zum überwiegenden Anteil aus Arginin. Vorteilhaft erweise beträgt der Argininanteil mehr als 60 Gewichts%. Das Protein kann aus der folgenden Gruppe ausgewählt sein: Protamin, Protaminbase, Protaminderivate oder -salze, vorzugsweise Protaminsulfat oder Protaminchlorid. Die vorgenannten Verbindungen haben vorteilhaft erweise keine antigenen Eigenschaften.

10 Die, vorteilhaft erweise einzelnstängig ausgebildete, Nukleinsäuresequenz kann ein Oligonukleotid oder ein Derivat davon sein. Das Derivat kann ein Phosphorothionat oder ein anionisches Derivat sein. Beim Oligonukleotid kann es sich insbesondere um ein DNA-Oligonukleotid handeln. Das ermöglicht einen Einsatz der synthetischen Partikel zur Antisense-Therapie.

20

Je nach Anwendungszweck kann der mittlere Durchmesser des Partikels im Bereich von 10 nm bis 100 µm liegen.

25 Das Partikel trägt vorteilhaft erweise eine elektrische Oberflächenladung, die vorzugsweise im Bereich von -40 mV bis +40 mV liegen kann. Dadurch kann weiter die Transfektionseffizienz erhöht werden.

Nach der verfahrensseitigen Maßgabe der Erfindung ist ein  
30 Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen synthetischen Partikel mit folgenden Schritten vorgesehen:

a) Herstellung einer ein Protein mit einem Molekulargewicht im Bereich von 3900 bis 4300 enthaltenden wässerigen ersten Lösung,

5

b) Versetzen der ersten Lösung mit einer eine Nukleinsäure- oder Nukleinsäurederivatsequenz enthaltenden zweiten Lösung und

10

c) Mischen der ersten und zweiten Lösung.

Das Verfahren ermöglicht aus einfache Weise die Herstellung der erfindungsgemäßen synthetischen Partikel.

15

Nach einem Ausgestaltungsmerkmal sind die erste und die zweite Lösung salzfrei. Zur Erzeugung einer vorgegebenen Oberflächenladung kann das molare Verhältnis von Nukleinsäure- oder Nukleinsäurederivatsequenz zu Protein eingestellt werden. Die vorgeschlagene Variante lässt sich besonders einfach durchführen.

20

Das Protein besteht zweckmäßigerweise zum überwiegenden Anteil aus Arginin, wobei es aus der folgenden Gruppe ausgewählt sein kann: Protamin, Protaminbase, Protaminderivate

25

oder -salze, vorzugsweise Protaminsulfat oder Protaminchlorid. Insbesondere Protamin, Protaminbase oder Protaminderivate können aus dem Sperma von Lachs gewonnen werden. Eine einfache und billige Verfügbarkeit ist damit gewährleistet.

30

Die, vorteilfpterweise einzelnstängig ausgebildete, Nukleinsäuresequenz kann ein Oligonukleotid oder ein Derivat davon

sein. Das Derivat kann ein Phosphorothionat oder ein anionisches Derivat sein. Der Durchmesser des Partikels kann je nach Anwendungszweck im Bereich von 10 nm bis 100 µm liegen. Es kann eine elektrische Oberflächenladung tragen, die zweckmäßigigerweise im Bereich von -40 mV bis +40 mV liegt.

Nach einer weiteren Lösung der Aufgabe ist die Verwendung eines Proteins mit einem Molekulargewicht im Bereich von 3900 bis 4300 zur Herstellung eines mindestens eine Nukleinsäure- oder Nukleinsäurederivatsequenz enthaltenden synthetischen Partikels vorgesehen.

Das vorteilhafterweise zum überwiegenden Anteil aus Arginin bestehende Protein kann aus der folgenden Gruppe ausgewählt sein: Protamin, Protaminbase, Protaminderivat oder -salze, vorzugsweise Protaminsulfat oder Protaminchlorid. Die, vorteilfesterweise einzelständig ausgebildete, Nukleinsäuresequenz kann ein Oligonukleotid oder ein Derivat davon sein. Das Derivat kann ein Phosphorothionat oder ein anionisches Derivat sein. Beim Oligonukleotid handelt es sich zweckmäßigigerweise um ein DNA-Oligonukleotid.

Das erfindungsgemäße synthetische Partikel ist vorteilhafterweise ausschließlich aus der Nukleinsäure bzw. dem Nukleinsäurederivat und dem Protein mit dem Molekulargewicht im Bereich von 3900 bis 4300 gebildet. Das Molekulargewicht des Proteins beträgt nach einer besonders vorteilhaften Ausführungsform zwischen 4000 und 4250.

Nachfolgend werden Ausführungsbeispiele der Erfindung an Hand der Zeichnung und an Hand von Beispielen näher erläutert. In der Zeichnungen zeigen:

5 Fig. 1a eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme synthetischer Partikel mit negativer Oberflächenladung,

10 Fig. 1b eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme synthetischer Partikel mit positiver Oberflächenladung,

Fig. 2 die Abhängigkeit der Partikelgröße von der Inkubationszeit,

15 Fig. 3 die Abhängigkeit der Oberflächenladung vom Verhältnis Protamin/ Oligonukleotid,

20 Fig. 4a eine confokale laserscannmikroskopische Aufnahme einer ersten Vero-Zelle.

Fig. 4b eine confokale laserscannmikroskopische Aufnahme einer zweiten Vero-Zelle.

25 Fig. 5 die Abhängigkeit der UV-Absorption bei 260 nm von der Retentionszeit für Partikel mit unterschiedlicher Protamin/Oligonukleotid-Zusammensetzung.

Beispiele:

1. Die Herstellung von Oligonukleotidpartikel mit negativer Oberflächenladung

5 500 µl einer Protaminlösung (50 µg/ml) in doppelt destilliertem Wasser werden in einem Eppendorf-Cap bei Raumtemperatur spontan zu 500 µl einer ebenso salzfreien Oligonukleotidlösung (100 µg/ml) gegeben. Als Oligonukleotide sind vorzugsweise einzelsträngige DNA-Oligonukleotide in der Lösung enthalten. Die Lösung wird danach intensiv für 1 Min. mit einem schnell laufenden Rührwerk gemischt. Die Partikelbildung setzt dabei spontan ein und ist nach einer halben Stunde abgeschlossen. Das Gewichtsverhältnis zwischen dem eingesetzten Protaminmolekül und dem Oligonukleotid beträgt ca. 0,75 bis 10 15 1. Das Gewichtsverhältnis zwischen Protamin und dem Oligonukleotid zur Partikelbildung beträgt ca. 1:2,5.

2. Die Herstellung von Oligonukleotidpartikel mit positiver Oberflächenladung

20 20 Basierend auf dem Verfahren in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren werden 500 µl einer Protaminlösung (250 µg/ml) in doppelt destilliertem Wasser in einem Eppendorf-Cap bei Raumtemperatur spontan zu 500 µl einer ebenso salzfreien Oligonukleotidlösung (100 µg/ml) gegeben. Das molare Verhältnis zwischen Protamin und dem Oligonukleotid beträgt ca. 3:1.

25 30 Fig. 1a zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines synthetischen Partikels mit negativer Oberflächenladung. Das Gewichtsverhältnis zwischen Protamin und Oligonukleotid hat hier 1:2 betragen. In Fig. 1b ist ein synthetisches Partikel mit positiver Oberflächenladung gezeigt. Das

16.12.96

8

Gewichtsverhältnis zwischen Protamin und Oligonukleotid hat hier 2,5:1 betragen.

5 Fig. 2 zeigt die Abhängigkeit der Inkubationszeit vom Gewichtsverhältnis Protamin/Oligonukleotid. Mit zunehmender Inkubationszeit nimmt die Partikelgröße zu. Es können so beliebige Partikelgrößen eingestellt werden.

10 Fig. 3 zeigt die Abhängigkeit des Zetapotentials vom Gewichtsverhältnis Protamin/Oligonukleotid. Mit zunehmendem Anteil an Protamin verschiebt sich das Zetapotential zu positiven Werten hin.

15 Die Fig. 4a und b zeigen im Vergleich die Aufnahme von Oligonukleotiden mittels synthetischer Partikel (Fig. 4a) in Vero-Zellen. In Fig. 4b ist eine Kontrollinkubation gelöster Oligonukleotide gezeigt. Die Oligonukleotidkonzentration beträgt 5 µg/ml bei einer Inkubationszeit von vier Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Es zeigt sich, dass unter Verwendung der erfindungsgemäßen synthetischen Partikel Oligonukleotide verstärkt 20 in Zellen aufgenommen werden.

25 In Fig. 5 ist die Stabilität der erfindungsgemäßen Partikel gegenüber einem enzymatischen Abbau durch Endonukleasen gezeigt. Es ist die UV- Absorption bei 260 nm über der Retentionszeit für verschiedene Protamin/Oligonukleotid-Verhältnisse aufgetragen. Die Ergebnisse zeigen, dass das erfindungsgemäße Partikel einen nahezu quantitativen Schutz vor einem enzymatischen Abbau gewährleistet.

30

1005A.DOC

## Patentansprüche

1. Synthetisches Partikel gebildet aus mindestens einer Nukleinsäure- oder Nukleinsäurederivatsequenz und einem Protein  
5 mit einem Molekulargewicht im Bereich von 3900 bis 4300.
2. Synthetisches Partikel nach Anspruch 1, wobei das Protein zum überwiegenden Anteil aus Arginin besteht.
- 10 3. Synthetisches Partikel nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Protein aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Protamin, Protaminbase, Protaminderivate oder -salze, vorzugsweise Protaminsulfat oder Protaminchlorid.
- 15 4. Synthetisches Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nukleinsäuresequenz einzelsträngig ausgebildet ist.
- 20 5. Synthetisches Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nukleinsäuresequenz ein Oligonukleotid oder ein Derivat davon ist.
- 25 6. Synthetisches Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Derivat ein Phosphothionat oder ein anionisches Derivat ist.
7. Synthetisches Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der mittlere Durchmesser des Partikels im Bereich von 10 nm bis 100 µm liegt.

10.12.98

10

8. Synthetisches Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Partikel eine elektrische Oberflächenladung trägt.

5 9. Synthetisches Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Oberflächenladung im Bereich von -40 mV bis +40 mV liegt.

10. Verfahren zur Herstellung synthetischer Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche mit folgenden Schritten:

10 a) Herstellen einer ein Protein mit einem Molekulargewicht im Bereich von 3900 bis 4300 enthaltenden wässrigen ersten Lösung,

15

b) Versetzen der ersten Lösung mit einer eine Nukleinsäure- oder Nukleinsäurederivatsequenz enthaltenden zweiten Lösung und

20

c) Mischen der ersten und der zweiten Lösung.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die erste und die zweite Lösung salzfrei sind.

25

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 oder 11, wobei zur Herstellung einer vorgegebenen Oberflächenladung das molare Verhältnis von Nukleinsäure- oder Nukleinsäurederivatsequenz zu Protein eingestellt wird.

30

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei das Protein zum überwiegenden Anteil aus Arginin besteht.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13, wobei das Protein aus der folgenden Gruppe ausgewählt wird: Protamin, Protaminbase, Protaminderivate oder -salze, vorzugsweise Protaminsulfat oder Protaminchlorid.
15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei Protamin, Protaminbase, Protaminderivate aus dem Sperma von Lachs gewonnen wird.
- 10 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 15, wobei die Nukleinsäuresequenz einzelsträngig ausgebildet ist.
- 15 17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei die Nukleinsäuresequenz ein Oligonukleotid oder ein Derivat davon ist.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 oder 17, wobei das Derivat ein Phosphothionat oder ein anionisches Derivat ist.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 18, wobei der Durchmesser des Partikels im Bereich von 10 nm bis 100 µm liegt.
- 20 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 19, wobei das Partikel eine elektrische Oberflächenladung trägt.
- 25 21. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 20, wobei die Oberflächenladung im Bereich von -40mV bis +40 mV liegt.
22. Verwendung eines Proteins mit einem Molekulargewicht im Bereich von 3900 bis 4300 zur Herstellung eines mindestens 30

eine Nukleinsäure- oder Nukleinsäurederivatsequenz enthaltenden synthetischen Partikels.

23. Verwendung nach Anspruch 22, wobei das Protein zum überwiegenden Anteil aus Arginin besteht.

24. Verwendung nach Anspruch 22 oder 23, wobei das Protein aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Protamin, Protaminbase, Protaminderivate oder -salze, vorzugsweise Protaminsulfat oder Protaminchlorid.

25. Verwendung nach einem der Ansprüche 22 bis 24, wobei die Nukleinsäuresequenz ein, vorzugsweise einzelsträngiges, Oligonukleotid oder ein, vorzugsweise als Phosphorothionat vorliegendes, Derivat davon ist.

10 12 13 14

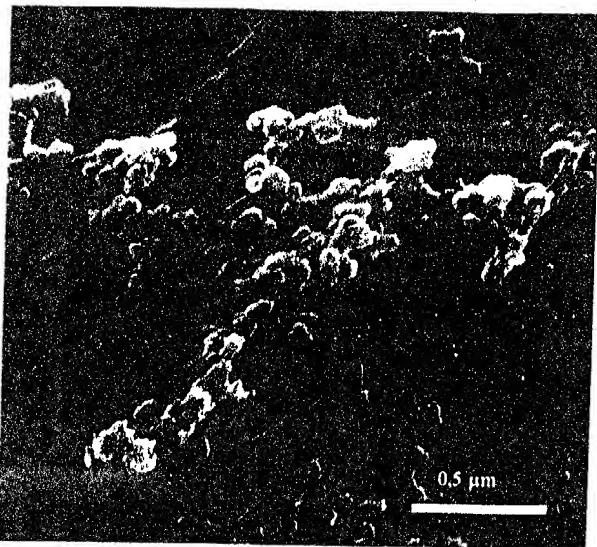


Fig. 1a

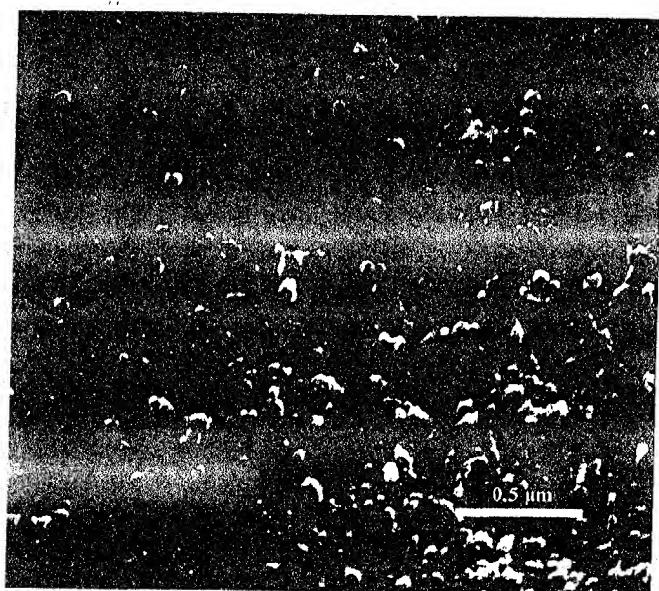


Fig. 1b

16.12.93

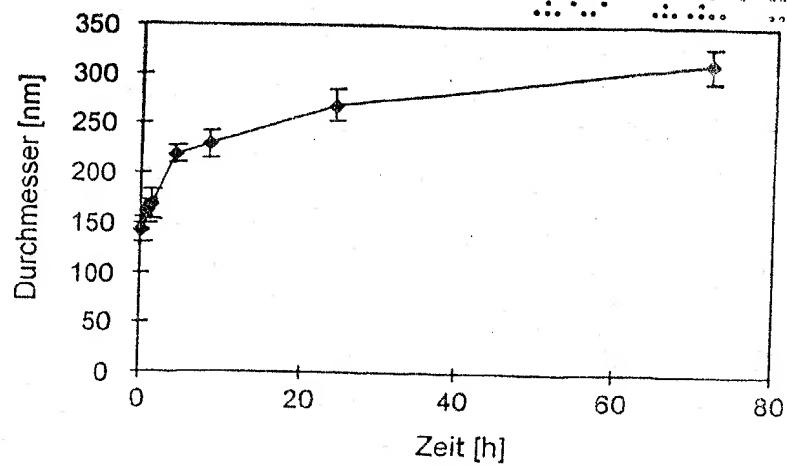


Fig. 2

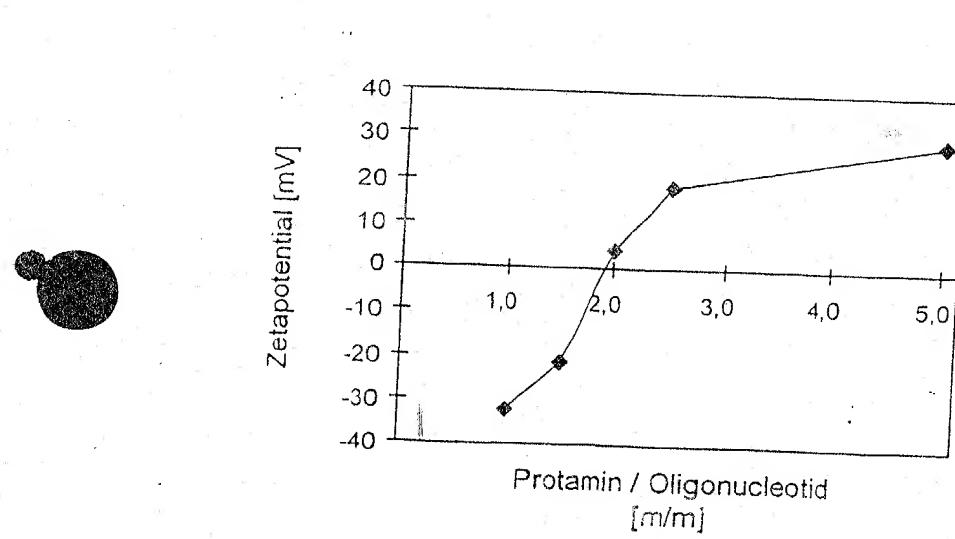


Fig. 3

ICD 0.00



Fig. 4a

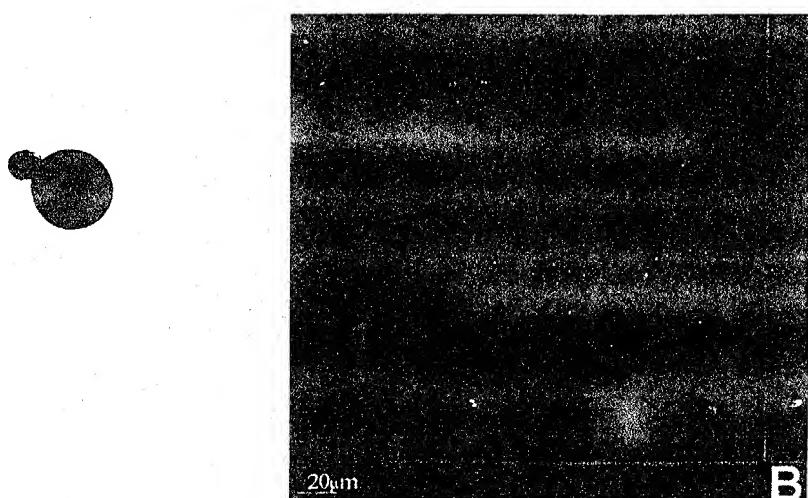


Fig. 4b

6. 10. 03

UV-Absorption bei 260 nm

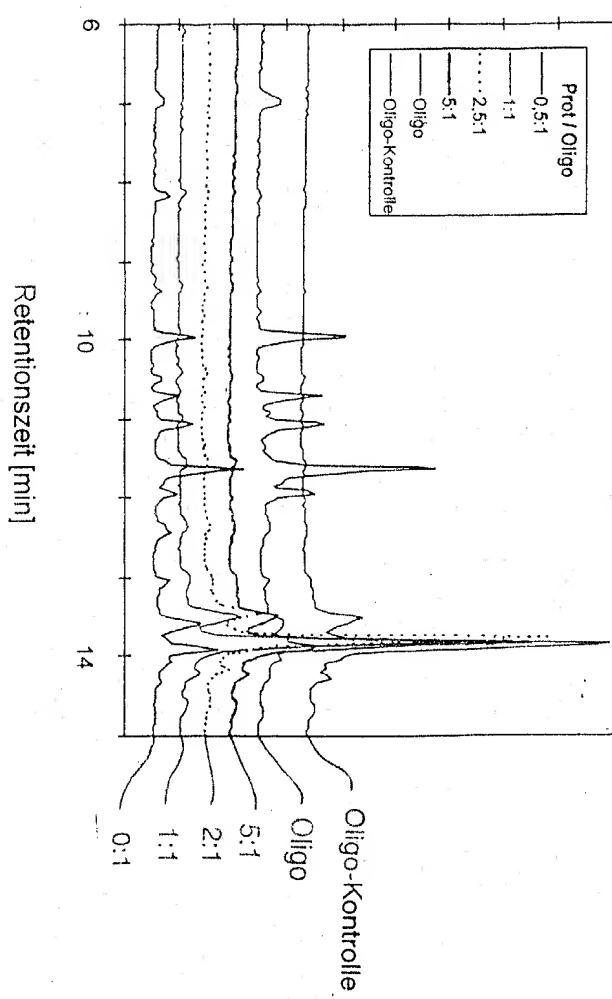


Fig. 5

1005A.DOC

13

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein synthetisches Partikel gebildet mindestens aus einer Nukleinsäure- oder Nukleinsäurederivat-  
5 sequenz und einem Protein mit einem Molekulargewicht im Be-  
reich von 3900 bis 4300.

Fig. 1.a



10<sup>3</sup> 10<sup>2</sup> 10<sup>1</sup>

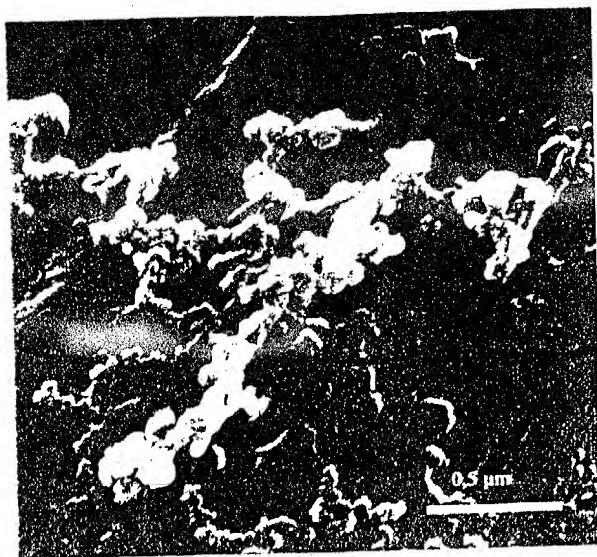


Fig. 1a